



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑩ DE 199 50 409 A 1

⑳ Aktenzeichen: 199 50 409.1
㉑ Anmeldetag: 20. 10. 1999
㉒ Offenlegungstag: 26. 4. 2001

⑤ Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00
C 07 H 21/02
C 07 H 21/04
C 12 P 13/04
C 12 P 13/08
C 12 N 15/74
C 12 N 1/21

B/p

DE 199 50 409 A 1

㉓ Anmelder:
Degussa-Hüls AG, 60311 Frankfurt, DE;
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

㉔ Erfinder:
Eickmann, Bernhard, Prof., 89081 Ulm, DE; Riedel,
Christian, 89233 Neu-Ulm, DE; Sahm, Hermann,
Prof., 52428 Jülich, DE; Möckel, Bettina, Dr., 40597
Düsseldorf, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Neue für das pck-Gen codierende Nukleotidsequenzen
- ⑤⑦ Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für das Polypeptid codiert, das durch das in dem hinterlegten E.coli-Stamm DSM 13047 auf Vektor pK19mobsacBΔck enthaltene pck-Gen expri-miert wird,
 - c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% iden-tisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - d) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynu-kleotiden von a), b) oder c), und
 - e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinander-folgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b), c) oder d).

DE 199 50 409 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind für das pck-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Threonin, durch Abschwächung des pck-Genes.

Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere Lysin und Threonin finden in der Tierernährung, in der Lebensmittelindustrie, in der pharmazeutischen Industrie und in der Humanmedizin Anwendung.

Es ist bekannt, daß diese Stoffe durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien insbesondere *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Stoffwechselprodukte sind und die gewünschte Aminosäure produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Öffentlichkeit zur Verfügung zu stellen.

Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Threonin, finden in der Tierernährung, in der Lebensmittelindustrie, in der pharmazeutischen Industrie und in der Humanmedizin Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung dieser Produkte bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für das genannte Polypeptid codiert und auf dem Plasmid pEK-pckA (Abb. 1) bzw. pEK-pckB (Abb. 2) enthalten ist,
- c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- d) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) oder c), und
- e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b), c) oder d).

Gegenstand der Erfindung ist ebenso eine in coryneformen Mikroorganismen replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest die Nukleotidsequenz enthält, die für das pck-Gen, dargestellt in der SEQ ID No. 1, codiert.

Gegenstand ist ebenfalls eine replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und/oder gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält
ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere pEK-pckA oder pEK-pckB, dargestellt in den Fig. 1 und 2
und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, in die die Δ pck-Deletion eingebaut wurde.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer zur Herstellung von DNA von Genen geeignet, die für Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Basenpaaren.

"Isoliert" bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

"Polynukleotid" bezieht sich im allgemeinen auf Polyrribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA und DNA oder modifizierte RNA und DNA handeln kann.

Unter "Polypeptiden" versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren erhalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen das Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der PEP-Carboxykinase und auch solche ein, die zu wenigstens 70% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders solche, die zu wenigstens 90% bis 95% Identität zu dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Threonin unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die L-Aminosäuren produzieren und in denen die für das pck-Gen codierend(en) Nukleotidsequenz(en) abgeschwächt, insbesondere auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff "Abschwächung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren insbesondere Lysin und Threonin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln.

Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind beispielsweise die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäure produzierende Mutanten bzw. Stämme,

wie beispielsweise die Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und

Corynebacterium glutamicum DSM5714 oder

wie beispielsweise die L-Threonin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum ATCC21649

Brevibacterium flavum BB69

Brevibacterium flavum DSM5399

Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269

Brevibacterium lactofermentum TBB-10

Corynebacterium glutamicum MH20-22B-DR17.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) (EC 4.1.1.49) kodierende pck-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

Zur Isolierung des pck-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252: 255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84: 2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16: 1563-1575) angelegt

wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-325) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHCT9 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide bzw. Plasmidvektoren wie beispielsweise pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)), pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19: 259-268), pACYC177 (Chang und Cohen, Journal of Bacteriology 134, 1141-1156 (1978)) oder pSC101 (Cohen und Chang, Journal of Bacteriology 132, 734-737 (1977)) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind.

Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, daß er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp hervorruft. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die von Goldie und Sanwal (Journal of Bacteriology 141: 1115-1121 (1980)) beschriebene *E. coli* Mutante HG4 von Bedeutung. Dieser Stamm trägt eine Mutation im *pck*-Gen, wodurch das Wachstum auf Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle stark beeinträchtigt wird. Durch Transformation mit einem das *pck*-Gen enthaltenden Vektor kann das Wachstum auf Succinat wiederhergestellt werden.

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend in Form kürzerer DNA-Fragmente in bekannte Plasmidvektoren subkloniert werden. Dadurch wird die Zuordnung des erfindungsgemäßen Gens zu einem spezifischen DNA-Abschnitt ermöglicht. Hierzu verwendet man aus dem Stand der Technik bekannte Plasmidvektoren wie z. B. pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder die von Bartolomé et al. (Gene 102, 75-78 (1991)) beschriebenen pSU-Vektoren. Vorzugsweise verwendet man jedoch Pendelvektoren, die sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Corynebacterium glutamicum* replizieren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) oder pEKO (Eikmanns et al., Gene 102 (1991)), um Untersuchungen in beiden Spezies durchführen zu können. Beispiele hierfür sind die Plasmide pEK-pckA (Fig. 1) und pEK-pckB (Fig. 2), die ausgehend von dem Plasmidvektor pEKO hergestellt wurden und das erfindungsgemäße *pck*-Gen tragen.

Die auf diese Weise charakterisierten DNA-Abschnitte werden anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert. Alternativ können die langen in Cosmiden klonierten DNA-Abschnitte direkt in Sequenziervektoren subkloniert werden. Beispiele für derartige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren sind die Plasmide pGEM-5zf(-) oder pGEM-5zf(+) der Firma Promega Corporation (Promega Protocols and Application Guide, Second Edition, 1991, part number Y981, Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74: 5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85, 2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Auf diese Weise wurde die neue für das *pck*-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *pck*-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Basenpaaren.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des *pck*-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren insbesondere Lysin und Threonin produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung kann entweder die Expression des *pck*-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Erniedrigung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z. B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart,

Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel ("Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutanicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein mutiertes pck-Gen ist das in Plasmid pK19mobsacBΔpck (Fig. 3) enthaltene Δpck-Allel. Das Δpck-Allel enthält lediglich die 5'- und die 3'-Flanke des pck-Gens; ein 1071 bp langer Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Dieses Δpck-Allel kann durch Integrationsmutagenese in coryneforme Bakterien eingebaut werden. Hierzu bedient man sich des oben angegebenen Plasmides pK19mobsacBΔpck, das in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist. Nach Übertragung durch Konjugation oder Transformation und homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross over"-Ereignisses und eines zweiten, eine Excision bewirkenden "cross over"-Ereignisses im pck-Gen erreicht man den Einbau des Δpck-Allels und erzielt einen Totalverlust der Enzymfunktion in dem jeweiligen Stamm.

Anleitungen und Erläuterungen zur Integrationsmutagenese findet man beispielsweise bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) oder Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915-927 (1998)).

Beispiele für Aminosäure produzierenden Stämme coryneformer Bakterien mit abgeschwächtem pck-Gen sind der Lysin produzierende Stamm MH20-22BΔpck und der Threonin-produzierende Stamm DM368-2Δpck.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des pck-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydropicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen überexprimiert werden (EP-B 0 197 335), oder
- gleichzeitig ein S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelndes DNA-Fragment amplifiziert werden (EP-A 0 088 166).

So können beispielsweise für die Herstellung von L-Threonin

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder die für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierenden hom^{tr}- bzw. hom^{FBR} Allele (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991); Remscheid et al., Journal of Bacteriology 173, 3228-3230 (1991)) überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren insbesondere Lysin und Threonin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des pck-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanz, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im feed batch (Zulaufverfahren) oder repeated feed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin und L-Threonin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storch (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin

Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugeführt werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum der gewünschten L-Aminosäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

-- *Escherichia coli* Stamm DH5 α /pK19mobsacB Δ pck als DSM 13047.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Homoserin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Methionin mit coryneformen Bakterien, insbesondere der Herstellung von L-Lysin und L-Threonin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Zu diesem Zweck wurden unter anderem Versuche mit dem Lysin-Produzenten *Corynebacterium glutamicum* Stamm MH20-22B und dem Threonin-Produzenten *Brevibacterium flavum* Stamm DM368-2 durchgeführt. Stamm MH20-22B ist als DSM5715 (EP-B-0 435 132) und Stamm DM368-2 als DSM5399 (EP-B-0 385 940) bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Beispiel 1

Isolierung des pck-Gens

Zur Isolierung des PEP-Carboxykinase-Gens (pck) aus *C. glutamicum* wurde basierend auf dem Cosmid pH79 (Hohn und Collins, Gene 11 (1980) 291-298) eine Cosmid-Genbank nach bekannter Methodik (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) angelegt. Dazu wurde aus *C. glutamicum* ATCC13032 chromosomale DNS isoliert (Eikmanns et al., Microbiology 140 (1994) 1817-1828) und mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut. Nach Ligation der erhaltenen Fragmente in die BamHI-Schnittstelle des Cosmids pH79 wurde der Ansatz in die Proteinhülle des Bakteriophagen Lambda verpackt und der *E. coli*-Stamm ED8654 (Murray et al. Molecular and General Genetics 150 (1997) 53-61) damit transfiziert. Die Verpackung der rekombinanten Cosmide in die Proteinhülle des Phagen Lambda erfolgte nach einer Methode von Sternberg et al. (Gene 1 (1979) 255-280), die Transfektion von *E. coli* ED8654 nach einer Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Aus insgesamt 30 der erhaltenen rekombinanten *E. coli*-Klone wurden die entsprechenden Cosmide isoliert (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) und einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym HindIII unterzogen. Es zeigte sich, daß 24 der untersuchten Cosmide Inserts besaßen, und daß die Inserts Größen von ungefähr 35 kb aufwiesen. Insgesamt 2200 Cosmid-tragende *E. coli*-Klone wurden vereinigt und aus diesem Gemisch nach bekanntem Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) die Cosmid-DNA präpariert.

Zur Isolierung des pck-Gens aus *C. glutamicum* wurde die Cosmid-Genbank in die PEP-Carboxykinase-defekte *E. coli*-Mutante HG4 (Goldie and Sanwal, Journal of Bacteriology 141 (1980) 115-1121) nach bekanntem Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert. Die Mutante HG4 ist aufgrund ihres PEP-Carboxykinase-Defektes nicht mehr in der Lage, auf Succinat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Nach Transformation der Cosmid-Genbank in diese Mutante wurden insgesamt 1200 Klone erhalten. Von diesen zeigten insgesamt zwei Klone Wachstum auf M9-Minimalmedium (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit Succinat (0,4%) als einziger Kohlenstoffquelle. Nach Isolierung der entsprechenden Cosmide (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) aus diesen Klonen und erneuter Transformation in die *E. coli*-Mutante HG4 waren die resultierenden Klone erneut in der Lage, auf M9-Medium mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Um das pck-Gen aus *C. glutamicum* auf einem kleineren Fragment einzugrenzen, wurden die zwei komplementierenden Cosmide mit den Restriktionsenzymen XhoI, ScaI und PvuII verdaut und nach bekannter Methode (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) auf einem 0,8%igen Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Fragmente im Größenbereich über 3,0 kb wurden durch Elektroelution (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) aus dem Gel isoliert und in die SalI (XhoI-Verdau), bzw. in die Klenow-behandelte EcoRI-Schnittstelle (ScaI- und PvuII-Verdau) des Vektors pEKO (Eikmanns et al., Gene 102 (1991) 93-98) ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde *E. coli* HG4 transfor-

miert und die erhaltenen Transformanten erneut auf ihre Fähigkeit untersucht, auf Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. In dem Transformationsansatz mit dem PvuII-Ligationsansatz zeigten sich sieben Klone, deren Plasmide der Mutante HG4 Wachstum auf Succinat erlaubten. Aus den rekombinanten Stämmen wurden die entsprechenden Plasmide isoliert und einer Restriktionskartierung unterzogen. Es zeigte sich, daß alle sieben Plasmide das gleiche 4,3-kb PvuII-Insert trugen, drei in der einen Orientierung, vier in der anderen. In Abhängigkeit von der Orientierung des Inserts im Vektor wurden die neu konstruierten Plasmide als pEK-pckA und pEK-pckB bezeichnet. Die Restriktionskarten bei der Plasmide sind in Fig. 1 und 2 dargestellt.

Beispiel 2

Sequenzierung des pck-Strukturgens und angrenzender Bereiche

Für die Sequenzierung wurde das circa 3,9 kb große EcoRI-Fragment aus pEK-pckA (dabei stammt eine EcoRI-Schnittstelle aus dem Vektor pEKO) nach bekannter Methode isoliert. Die überhängenden Enden des Fragmentes wurden mit Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) und in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pGEM-SZf(+)(Promega Corporation, Madison, WI, USA) ligiert. Die Insertion des so erzeugten Plasmides wurde durch die Kettenabbruch-Sequenzierungsmethode (Sanger et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 74 (1977) 5463-5467) sequenziert. Sie ist als SEQ ID No. 1 dargestellt. Die erhaltene Nukleotidsequenz von 3935 bp wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein offenes Leseraster von 1830 bp Länge, das für ein Protein bestehend aus 610 Aminosäuren kodiert.

Beispiel 3

Überexpression des pck-Gens

Durch Elektroporation mit nachfolgender Selektion auf Kanamycin (50 µg/ml) enthaltenden BHI-Agarplatten (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 65 (1989) 299-304) wurden die Plasmide pEK-pckA und pEK-pckB in den *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 eingeführt und die resultierenden Stämme als ATCC13032/pEK-pckA und ATCC13032/pEK-pckB bezeichnet. Diese beiden Stämme und der Ausgangsstamm wurden in Luria-Bertani-Komplexmedium [Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press] gezüchtet und der PEP-Carboxykinase-Test entsprechend der Methode wie sie von Bente and Lardy [Journal of Biological Chemistry 251 (1976) 2916-2921] beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 1 dargestellt und zeigt, daß die PEP-Carboxykinase-Aktivität in den beiden Stämmen mit den Plasmiden pEK-pckA bzw. pEK-pckB 10- bis 12fach höher ist als im Ausgangsstamm.

Tabelle 1

PEP-Carboxykinase-Aktivität in verschiedenen Stämmen

Stamm	PEP-Carboxykinase (nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)
ATCC13032	120
ATCC13032/pEK-pckA	1270
ATCC13032/pEK-pckB	1510

Beispiel 4

Herstellung eines Integrationsplasmides für die Deletionsmutagenese des pck-Gens

Für die Inaktivierung des PEP-Carboxykinase-Gens wurde aus dem Vektor pEK-pckB (Fig. 2) das EcoRI-SacI Fragment des pck-Gens isoliert und in den Vektor pGEM-7Zf(+)(Promega Corporation, Madison, WI, USA) einligiert. Aus dem resultierenden Plasmid wurde ein pck-internes 1,07 kb HindII-HindIII-Fragment deletiert, anschließend das pck-Gen mit der 1,07-kb-Deletion als BfrI-SacI-Fragment isoliert und nach Auffüllen der überhängenden Enden in den in *C. glutamicum* nicht-replikativen Vektor pk19mobsacB (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)) ligiert. In dem so konstruierten Integrationsplasmid pK19mobsacBΔpck (Fig. 3) grenzt der 5'-Bereich des pck-Gens (350 bp) direkt an den 3'-Bereich des pck-Gens (340 bp); im Genom sind die beiden Bereiche durch 1071 bp voneinander getrennt. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *EL. coli* DH5α als Wirt durchgeführt.

Beispiel 5

Deletionsmutagenese des *pck*-Gens in dem Lysin-Produzenten MH20-22B

Mit dem Integrationsplasmid pK19mobsacBΔpck wurde dann *E. coli* S17-1 transformiert (Simon et al., Bio/Technology 1,784-791 (1983)). Dieser Stamm ermöglicht den Transfer eines Plasmides nach *Corynebacterium glutamicum* durch Konjugation (Schäfer et al., Journal of Bacteriology 172 (1990) 1663-1666). Als Rezipient der Konjugation wurde der Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B verwendet (Schrumpf et al., Applied Microbiology and Biotechnology 37 (1992) 566-571). Aus der Konjugation zwischen *E. coli* S17-1/pK19mobsacBΔpck und *C. glutamicum* MH20-22B und nachfolgenden Selektion auf Luria-Bertani-Agar-Platten mit Kanamycin (25 µg/ml) und Nalidixinsäure (50 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten. Zur Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis, das zur Excision des Vektors samt *pck*-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten auf Antibiotika-freiem Luria-Bertani-Komplexmedium [Sambrook et al. Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press] mit 1% Glucose kultiviert und dann auf dem gleichen Medium plus 10% Saccharose plattiert. Das auf dem Vektor pK19mobsacB vorhandene *sacB*-Gen kodiert für das Enzym Levansucrase und führt zur Synthese von Levan aus Saccharose. Da Levan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum* Zellen, die das Integrationsplasmid verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 30 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 11 der getesteten Klone konnte neben der Saccharose-Resistenz auch die gewünschte Kanamycin-Sensitivität bestätigt werden. In diesen 11 Klonen war also der Vektorhintergrund wieder excisiert. Ob auch die gewünschte Deletion erfolgt war, wurde durch Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geprüft. Dafür wurde chromosomale DNA von einer Kolonie des Ausgangsstamms und von Kolonien der 11 Kanamycin-sensitiven Klone freigesetzt. Hierzu wurde die jeweilige Kolonie mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen, in 50 µl H₂O suspendiert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Jeweils 1 µl der erhaltenden Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die die Bereiche von Nukleotid 2136 bis 2158 und von 3815 bis 3793 in der SEQ ID No. 1 abdecken. Die PCR-Bedingungen waren: Vorabdenaturierung: 150 Sekunden bei 94°C; Denaturierung 60 Sekunden bei 94°C; Hybridisierung 30 Sekunden bei 60°C; Amplifizierung 120 Sekunden bei 72°C; 30 Zyklen, End-Extension 240 Sekunden bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes wurde aufgrund der gewählten Primer ein PCR-Produkt von 1,68 kb erwartet. In der PCR mit der *pck*-Deletionsmutante wurde ein PCR-Produkt von 0,61 kb erwartet. Bei einem Klon wurde ein 0,61 kb großes PCR-Produkt erhalten. Dadurch wurde die gewünschte Deletion des internen 1071 bp großen *pck*-Fragmentes bei diesem Klon nachgewiesen. Der Klon wurde als MH20-22BΔpck bezeichnet. In den Ansätzen der übrigen Klone wurde das 1,68 kb PCR-Produkt nachgewiesen. In diesen war der Vektor also so excisiert, daß die genomische Ausgangssituation wieder hergestellt war.

Der Stamm MH20-22BΔpck und der Ausgangsstamm MH20-22B wurden in Luria-Bertani-Komplexmedium plus 1% Glucose angezogen und der PEP-Carboxykinase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Bente and Lardy (Journal of Biological Chemistry 251 (1976) 2916-2921) beschrieben ist, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 2) zeigt, daß in der Mutante MH20-22BΔpck im Gegensatz zum Ausgangsstamm MH20-22B keine PEP-Carboxykinase-Aktivität mehr nachweisbar ist.

Tabelle 2

PEP-Carboxykinase-Aktivität in verschiedenen Stämmen

Stamm	PEP-Carboxykinase (nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)
MH20-22B	65
MH20-22BΔpck	< 3 *

* 3 nmol min⁻¹ mg Protein⁻¹ ist die Nachweisgrenze

Beispiel 6

Produktion von L-Lysin

Zur Untersuchung der Auswirkung der Inaktivierung des PEP-Carboxykinase-Gens auf die Lysinproduktion wurde der Stamm MH20-22B (Schrumpf et al., Applied Microbiology and Biotechnology 1992, 37: 566-571) sowie die PEP-Carboxykinase-negative Mutante MH20-22BΔpck (Beispiel 5) in Luria-Bertani-Komplexmedium plus 1% Glucose kultiviert und das Fermentationsmedium CGXII (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 1993, 175: 5595-5603) aus den beiden Vorkulturen beimpft (5% Inokulum, Optische Dichte bei 600 nm circa 0,5). Das Medium enthielt zusätzlich 3 mM Leucin, da die beiden Stämme Leucin-auxotroph sind. Die Ansätze bestanden aus jeweils 60 ml Kultur, die in 500 ml-Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen enthalten waren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 28°C auf einem Rotationsschüttler vom Typ Certomat S/50 (Firma B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) bei 120 Upm

wurde die Konzentration des in das Medium ausgeschiedenen Lysins bestimmt.

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Jones und Gilligan, Journal of Chromatography 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Lysinkonzentration im Kulturüberstand der Stämme MH20-22B und MH20-22B Δ pck

Stamm	L-Lysin (mM)
MH20-22B	54
MH20-22B Δ pck	65

Beispiel 7

Deletionsmutagenese des pck-Gens in dem Threonin-Produzenten DM368-2

Mit dem E. coli-Stamm S17-1/pk19mobsacB Δ pck wurde wie im Fall des Lysinproduzenten MH20-22B eine Konjugation mit dem Threoninproduzenten DM368-2 mit anschließender Selektion auf die erste und zweite Rekombination durchgeführt (siehe Beispiel 5). Von 30 Saccharose-resistenten Klonen waren 14 Kanamycin-sensitiv. Von diesen konnte in zweien, als DM368-2 Δ pck16 und DM368-2 Δ pck18 bezeichneten Klonen mit Hilfe der in Beispiel 5 beschriebenen PCR-Analyse die 1071 bp-Deletion im pck-Gen nachgewiesen werden.

Ein Enzymtest mit dem Ausgangsstamm DM368-2 und den beiden pck-Deletionsstämmen DM368-2 Δ pck16 und DM368-2 Δ pck18, durchgeführt wie in Beispiel 5 beschrieben, zeigte, daß in diesen Mutanten keine PEP-Carboxykinase-Aktivität nachweisbar ist (Tabelle 4).

Tabelle 4

PEP-Carboxykinase-Aktivität in verschiedenen Stämmen

Stamm	PEP-Carboxykinase (nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)
DM368-2	79
DM368-2B Δ pck16	< 3 *
DM368-2B Δ pck18	< 3 *

* 3 nmol min⁻¹ mg Protein⁻¹ ist die Nachweisgrenze

Beispiel 8

Produktion von L-Threonin

Analog zu den Experimenten zur L-Lysinproduktion wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand des PEP-Carboxykinase-defekten Stammes DM368-2B Δ pck16 im Vergleich mit dem Ausgangsstamm DM368-2 untersucht. Dazu wurden die beiden Stämme in Luria-Bertani-Komplexmedium plus 1% Glucose gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII aus den Vorkulturen beimpft. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 28°C auf dem Rotationschüttler bei 120 Upm wurde die Konzentration des in das Medium ausgeschiedenen Threonins bestimmt.

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (siehe oben). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Threoninkonzentration im Kulturüberstand der Stämme DM368-2 und DM368-2 Δ pck16

5	Stamm	L-Threonin (mM)
	DM368-2	8
10	DM368-2 Δ pck16	22

15

Abbildungen

Folgende Figuren sind beigelegt:

Fig. 1 Restriktionskarte des Plasmides pEK-pckA,

20 Fig. 2 Restriktionskarte des Plasmides pEK-pckB,

Fig. 3 Restriktionskarte des Plasmides pk19mobSacB Δ pck.

Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um ca.-Werte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit erhalten werden.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

25 sacB: sacB-Gen

ori V: Replikationsursprung V

ori T: Replikationsursprung für den Transfer

Km-r: Kanamycin Resistenz

KpnI: Schnittstelle des Restriktionsenzym KpnI

30 HindIII: Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII

HindII: Schnittstelle des Restriktionsenzym HindII

PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI

SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI

XbaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI

35 SalI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SalI

SacI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SacI

BfrI: Schnittstelle des Restriktionsenzym BfrI

ScaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym ScaI

BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI

40 EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI

pck': 3'-terminales Fragment des pck-Gens

pck': 5'-terminales Fragment des pck-Gens

pck: pck-Gen.

45

50

55

60

65

DE 199 50 409 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG
Forschungszentrum Jülich GmbH 5

<120> Neue für das pck-Gen codierende Nukleotidsequenzen.

<130> 990110BT

<140> 10
<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1 15

<210> 1
<211> 3935
<212> DNA 20
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
<222> (2022)..(3851) 25

<400> 1
ctggcagttc tcctaattga tcgcgggaat tatcagaaat agacattatt tgttatTTTT 60
cctgttcaac tttaaaactt caatattcgt gagtttgat gaatccctag agcactacct 120 30
tttagacctc tcgctgcaat ttaggccagt tgagatttaa gctttccgac gattcttctc 180
attactgcaa tcgtaccggc gatggtggac acgatgacat gaaagagcat taaagcaatc 240 35
aagtacaggc tgaagtagtt aaaccactcc actccgggtgc tctgtgataa aaaatgcgca 300
cccaaactca aagtccaac tgggaaggta ctggcccacc atgtggggct gtatgtcgcc 360 40
cctttgaaaa cagctctgta gaacacaaag tgagcgatgg ctcccagagg aatcgtaaaa 420
attcccatga tgatgccgta aataatgcc attgtgattg ctgtcttgga tccaaaggac 480
gcaccgatga gctgagctgc tgcagtggat tggcccacca tacccaaagg aatccatgat 540 45
gttgggtgtt ccatcagtggt gatgccctgc gccttggggc cgaaatagta gaaatacact 600
cgggtaaaaa ctgctggtgc agacgcaaaa gttaaaagga agagcccgaa agaaaccac 660 50
agcatcgccg gaagttcaaa gtgctcatgg agttgtgctg ccgaggtgga agcaaccatc 720
ggcgtgacaa gaggaagacc ccacgcaaaa gttggtgtgc ccgccttaga tcgcaaaatg 780 55
gccgttatat ataaggaata ggcaacaagt cccacggctg tgccaataga ccagcacaca 840
aacataaatc cccacagatc atcaccaaaa actacggggc ttgcagttcc caatgcgatc 900
aaacccatgg acagcattgc ccatgccggc atgacttcag ttttgaatga aggagagcgg 960 60
tagattagcc aaccgccaat aatgacaatt gccaccacaa cagctaacgc gaagaagaaa 1020 65

60

DE 199 50 409 A 1

cgc acc ttc atc tgc tcc gag aag gaa gaa gat gct ggc cca acc aac	2324	
Arg Thr Phe Ile Cys Ser Glu Lys Glu Glu Asp Ala Gly Pro Thr Asn		
90 95 100		
aac tgg gct cca cca cag gca atg aag gac gaa atg tcc aag cat tac	2372	5
Asn Trp Ala Pro Pro Gln Ala Met Lys Asp Glu Met Ser Lys His Tyr		
105 110 115		
gct ggt tcc atg aag ggg cgc acc atg tac gtc gtg cct ttc tgc atg	2420	10
Ala Gly Ser Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val Val Pro Phe Cys Met		
120 125 130		
ggt cca atc agc gat ccg gac cct aag ctt ggt gtg cag ctc act gac	2468	15
Gly Pro Ile Ser Asp Pro Asp Pro Lys Leu Gly Val Gln Leu Thr Asp		
135 140 145		
tcc gag tac gtt gtc atg tcc atg cgc atc atg acc cgc atg ggt att	2516	20
Ser Glu Tyr Val Val Met Ser Met Arg Ile Met Thr Arg Met Gly Ile		
150 155 160 165		
gaa gcg ctg gac aag atc ggc gcg aac ggc agc ttc gtc agg tgc ctc	2564	25
Glu Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg Cys Leu		
170 175 180		
cac tcc gtt ggt gct cct ttg gag cca ggc cag gaa gac gtt gca tgg	2612	30
His Ser Val Gly Ala Pro Leu Glu Pro Gly Gln Glu Asp Val Ala Trp		
185 190 195		
cct tgc aac gac acc aag tac atc acc cag ttc cca gag acc aag gaa	2660	35
Pro Cys Asn Asp Thr Lys Tyr Ile Thr Gln Phe Pro Glu Thr Lys Glu		
200 205 210		
att tgg tcc tac ggt tcc ggc tac ggc gga aac gca atc ctg gca aag	2708	40
Ile Trp Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Asn Ala Ile Leu Ala Lys		
215 220 225		
aag tgc tac gca ctg cgt atc gca tct gtc atg gct cgc gaa gaa gga	2756	45
Lys Cys Tyr Ala Leu Arg Ile Ala Ser Val Met Ala Arg Glu Glu Gly		
230 235 240 245		
tgg atg gct gag cac atg ctc atc ctg aag ctg atc aac cca gag ggc	2804	50
Trp Met Ala Glu His Met Leu Ile Leu Lys Leu Ile Asn Pro Glu Gly		
250 255 260		
aag gcg tac cac atc gca gca gca ttc cca tct gct tgt ggc aag acc	2852	55
Lys Ala Tyr His Ile Ala Ala Ala Phe Pro Ser Ala Cys Gly Lys Thr		
265 270 275		
aac ctc gcc atg atc act cca acc atc cca ggc tgg acc gct cag gtt	2900	60
Asn Leu Ala Met Ile Thr Pro Thr Ile Pro Gly Trp Thr Ala Gln Val		
280 285 290		
gtt ggc gac gac atc gct tgg ctg aag ctg cgc gag gac ggc ctc tac	2948	65
Val Gly Asp Asp Ile Ala Trp Leu Lys Leu Arg Glu Asp Gly Leu Tyr		
295 300 305		

DE 199 50 409 A 1

	gca gtt aac cca gaa aat ggt ttc ttc ggt gtt gct cca ggc atc aac	2996
	Ala Val Asn Pro Glu Asn Gly Phe Phe Gly Val Ala Pro Gly Thr Asn	
	310 315 320 325	
5	tac gca tcc aac cca atc gcg atg aag acc atg gaa cca ggc aac acc	3044
	Tyr Ala Ser Asn Pro Ile Ala Met Lys Thr Met Glu Pro Gly Asn Thr	
	330 335 340	
10	ctg ttc acc aac gtg gca ctc acc gac gac ggc gac atc tgg tgg gaa	3092
	Leu Phe Thr Asn Val Ala Leu Thr Asp Asp Gly Asp Ile Trp Trp Glu	
	345 350 355	
15	ggc atg gac ggc gac gcc cca gct cac ctc att gac tgg atg ggc aac	3140
	Gly Met Asp Gly Asp Ala Pro Ala His Leu Ile Asp Trp Met Gly Asn	
	360 365 370	
20	gac tgg acc cca gag tcc gac gaa aac gct gct cac cct aac tcc cgt	3188
	Asp Trp Thr Pro Glu Ser Asp Glu Asn Ala Ala His Pro Asn Ser Arg	
	375 380 385	
25	tac tgc gta gca atc gac cag tcc cca gca gca gca cct gag ttc aac	3236
	Tyr Cys Val Ala Ile Asp Gln Ser Pro Ala Ala Ala Pro Glu Phe Asn	
	390 395 400 405	
30	gac tgg gaa ggc gtc aag atc gac gca atc ctc ttc ggt gga cgt cgc	3284
	Asp Trp Glu Gly Val Lys Ile Asp Ala Ile Leu Phe Gly Gly Arg Arg	
	410 415 420	
35	gca gac acc gtc cca ctg gtt acc cag acc tac gac tgg gag cac ggc	3332
	Ala Asp Thr Val Pro Leu Val Thr Gln Thr Tyr Asp Trp Glu His Gly	
	425 430 435	
40	acc atg gtt ggt gca ctg ctc gca tcc ggt cag acc gca gct tcc gca	3380
	Thr Met Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Gln Thr Ala Ala Ser Ala	
	440 445 450	
45	gaa gca aag gtc ggc aca ctc cgc cac gac cca atg gca atg ctc cca	3428
	Glu Ala Lys Val Gly Thr Leu Arg His Asp Pro Met Ala Met Leu Pro	
	455 460 465	
50	ttc att ggc tac aac gct ggt gaa tac ctg cag aac tgg att gac atg	3476
	Phe Ile Gly Tyr Asn Ala Gly Glu Tyr Leu Gln Asn Trp Ile Asp Met	
	470 475 480 485	
55	ggt aac aag ggt ggc gac aag atg cca tcc atc ttc ctg gtc aac tgg	3524
	Gly Asn Lys Gly Gly Asp Lys Met Pro Ser Ile Phe Leu Val Asn Trp	
	490 495 500	
60	ttc cgc cgt ggc gaa gat gga cgc ttc ctg tgg cct ggc ttc ggc gac	3572
	Phe Arg Arg Gly Glu Asp Gly Arg Phe Leu Trp Pro Gly Phe Gly Asp	
	505 510 515	
65	aac tct cgc gtt ctg aag tgg gtc atc gac cgc atc gaa ggc cac gtt	3620
	Asn Ser Arg Val Leu Lys Trp Val Ile Asp Arg Ile Glu Gly His Val	
	520 525 530	

DE 199 50 409 A 1

ggc gca gac gag acc gtt gtt gga cac acc gct aag gcc gaa gac ctc	3668	
Gly Ala Asp Glu Thr Val Val Gly His Thr Ala Lys Ala Glu Asp Leu		
535 540 545		
gac ctc gac ggc ctc gac acc cca att gag gat gtc aag gaa gca ctg	3716	5
Asp Leu Asp Gly Leu Asp Thr Pro Ile Glu Asp Val Lys Glu Ala Leu		
550 555 560 565		
acc gct cct gca gag cag tgg gca aac gac gtt gaa gac aac gcc gag	3764	10
Thr Ala Pro Ala Glu Gln Trp Ala Asn Asp Val Glu Asp Asn Ala Glu		
570 575 580		
tac ctc act ttc ctc gga cca cgt gtt cct gca gag gtt cac agc cag	3812	15
Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Pro Arg Val Pro Ala Glu Val His Ser Gln		
585 590 595		
ttc gat gct ctg aag gcc cgc att tca gca gct cac gct taaagttcac	3861	
Phe Asp Ala Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ala His Ala		20
600 605 610		
gcttaagaac tgctaaataa caagaaaggc tcccaccgaa agtgggagcc tttcttgctg	3921	
ttaagcgatg aatt	3935	25
<210> 2		
<211> 610		
<212> PRT		30
<213> Corynebacterium glutamicum		
<400> 2		
Met Thr Thr Ala Ala Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ala Pro Thr Lys		35
1 5 10 15		
Asn Lys Glu Leu Leu Asn Trp Ile Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Gln		
20 25 30		
Pro Glu Ala Val Val Phe Val Asp Gly Ser Gln Ala Glu Trp Asp Arg		40
35 40 45		
Met Ala Glu Asp Leu Val Glu Ala Gly Thr Leu Ile Lys Leu Asn Glu		45
50 55 60		
Glu Lys Arg Pro Asn Ser Tyr Leu Ala Arg Ser Asn Pro Ser Asp Val		
65 70 75 80		
Ala Arg Val Glu Ser Arg Thr Phe Ile Cys Ser Glu Lys Glu Glu Asp		50
85 90 95		
Ala Gly Pro Thr Asn Asn Trp Ala Pro Pro Gln Ala Met Lys Asp Glu		55
100 105 110		
Met Ser Lys His Tyr Ala Gly Ser Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val		
115 120 125		
Val Pro Phe Cys Met Gly Pro Ile Ser Asp Pro Asp Pro Lys Leu Gly		60
130 135 140		

65

DE 199 50 409 A 1

Val Gln Leu Thr Asp Ser Glu Tyr Val Val Met Ser Met Arg Ile Met
 145 150 155 160
 5 Thr Arg Met Gly Ile Glu Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ala Asn Gly Ser
 165 170 175
 Phe Val Arg Cys Leu His Ser Val Gly Ala Pro Leu Glu Pro Gly Gln
 180 185 190
 10 Glu Asp Val Ala Trp Pro Cys Asn Asp Thr Lys Tyr Ile Thr Gln Phe
 195 200 205
 15 Pro Glu Thr Lys Glu Ile Trp Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Asn
 210 215 220
 Ala Ile Leu Ala Lys Lys Cys Tyr Ala Leu Arg Ile Ala Ser Val Met
 225 230 235 240
 20 Ala Arg Glu Glu Gly Trp Met Ala Glu His Met Leu Ile Leu Lys Leu
 245 250 255
 Ile Asn Pro Glu Gly Lys Ala Tyr His Ile Ala Ala Ala Phe Pro Ser
 260 265 270
 25 Ala Cys Gly Lys Thr Asn Leu Ala Met Ile Thr Pro Thr Ile Pro Gly
 275 280 285
 30 Trp Thr Ala Gln Val Val Gly Asp Asp Ile Ala Trp Leu Lys Leu Arg
 290 295 300
 Glu Asp Gly Leu Tyr Ala Val Asn Pro Glu Asn Gly Phe Phe Gly Val
 305 310 315 320
 35 Ala Pro Gly Thr Asn Tyr Ala Ser Asn Pro Ile Ala Met Lys Thr Met
 325 330 335
 40 Glu Pro Gly Asn Thr Leu Phe Thr Asn Val Ala Leu Thr Asp Asp Gly
 340 345 350
 Asp Ile Trp Trp Glu Gly Met Asp Gly Asp Ala Pro Ala His Leu Ile
 355 360 365
 45 Asp Trp Met Gly Asn Asp Trp Thr Pro Glu Ser Asp Glu Asn Ala Ala
 370 375 380
 50 His Pro Asn Ser Arg Tyr Cys Val Ala Ile Asp Gln Ser Pro Ala Ala
 385 390 395 400
 Ala Pro Glu Phe Asn Asp Trp Glu Gly Val Lys Ile Asp Ala Ile Leu
 405 410 415
 55 Phe Gly Gly Arg Arg Ala Asp Thr Val Pro Leu Val Thr Gln Thr Tyr
 420 425 430
 Asp Trp Glu His Gly Thr Met Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Gln
 435 440 445
 60 Thr Ala Ala Ser Ala Glu Ala Lys Val Gly Thr Leu Arg His Asp Pro
 450 455 460
 65

Met	Ala	Met	Leu	Pro	Phe	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ala	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln		
465					470				475					480			
Asn	Trp	Ile	Asp	Met	Gly	Asn	Lys	Gly	Gly	Asp	Lys	Met	Pro	Ser	Ile		5
				485				490					495				
Phe	Leu	Val	Asn	Trp	Phe	Arg	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly	Arg	Phe	Leu	Trp		10
			500					505					510				
Pro	Gly	Phe	Gly	Asp	Asn	Ser	Arg	Val	Leu	Lys	Trp	Val	Ile	Asp	Arg		
		515				520					525						
Ile	Glu	Gly	His	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Thr	Val	Val	Gly	His	Thr	Ala		15
	530					535					540						
Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Thr	Pro	Ile	Glu	Asp		
545				550						555				560			
Val	Lys	Glu	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Ala	Glu	Gln	Trp	Ala	Asn	Asp	Val		20
				565					570					575			
Glu	Asp	Asn	Ala	Glu	Tyr	Leu	Thr	Phe	Leu	Gly	Pro	Arg	Val	Pro	Ala		
			580					585					590				25
Glu	Val	His	Ser	Gln	Phe	Asp	Ala	Leu	Lys	Ala	Arg	Ile	Ser	Ala	Ala		
		595					600					605					
His	Ala																30
	610																

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für das genannte Polypeptid codiert und auf dem Plasmid pEK-pckA (Abb. 1) bzw. pEK-pckB (Abb. 2) enthalten ist,
 - c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - d) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) oder c), und
 - e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b), c) oder d).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1. oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und/oder gegebenenfalls
 - (v) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Vektor pEK-pckA, dargestellt in Fig. 1.
8. Vektor pEK-pckB, dargestellt in Fig. 2.
9. Vektor pk19mobsacBΔpck, dargestellt in Fig. 3 und hinterlegt in dem Stamm E. coli DH5α unter der Nummer DSM 13047
10. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen der Vektoren gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 enthalten oder in die die Δpck-Deletion eingebaut wurde.
11. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man
 - a) das Polynukleotid gemäß Anspruch 1 abschwächt oder die Aktivität des Polypeptids herabsetzt, für das das genannte Polynukleotid codiert.

b) das gewünschte Produkt im Medium oder in den Zellen der Bakterien anreichert und

c) das Produkt isoliert

12. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien der Gattung *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Abschwächung durch Integrationsmutagenese mit Hilfe des Plasmides pK19mobsacBΔpck, dargestellt in Fig. 3 und hinterlegt als DSM 13047, erzielt.

14. Verfahren gemäß 12, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Herstellung von L-Lysin Bakterien fermentiert, in denen man gegebenenfalls

- gleichzeitig das für das Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen überexprimiert, und/oder

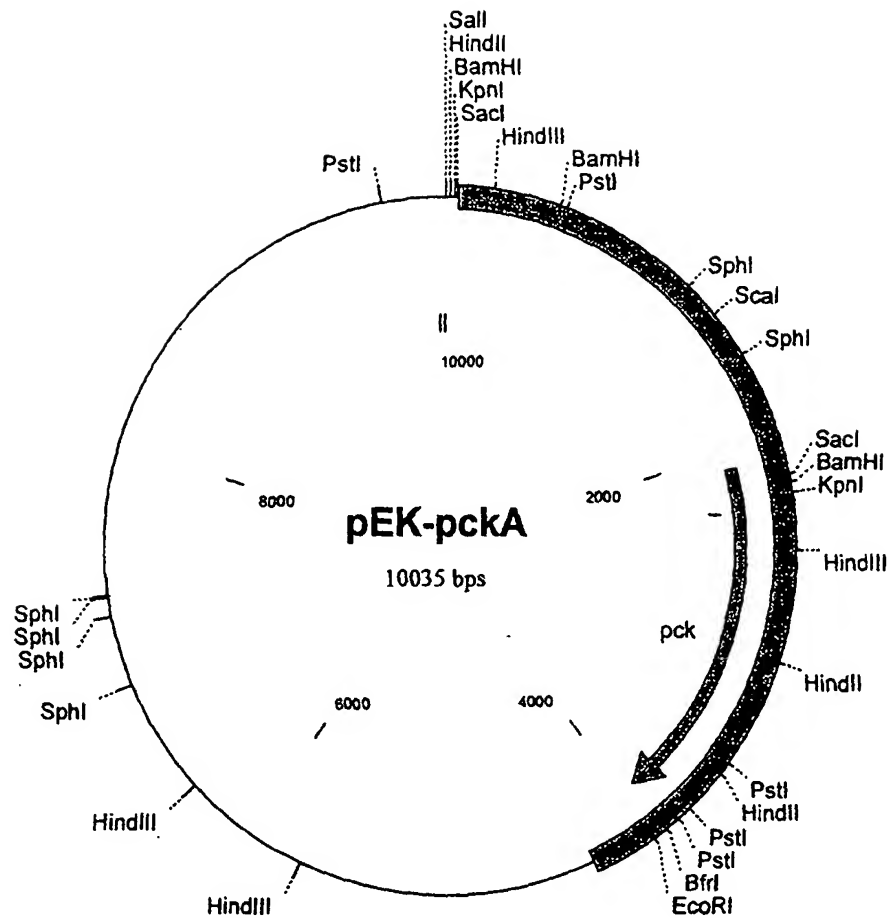
- gleichzeitig ein S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelndes DNA-Fragment amplifiziert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Herstellung von L-Threonin Bakterien fermentiert, in denen man gegebenenfalls gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen und/oder für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom^{dr}- bzw. hom^{FBR}-Allele überexprimiert.

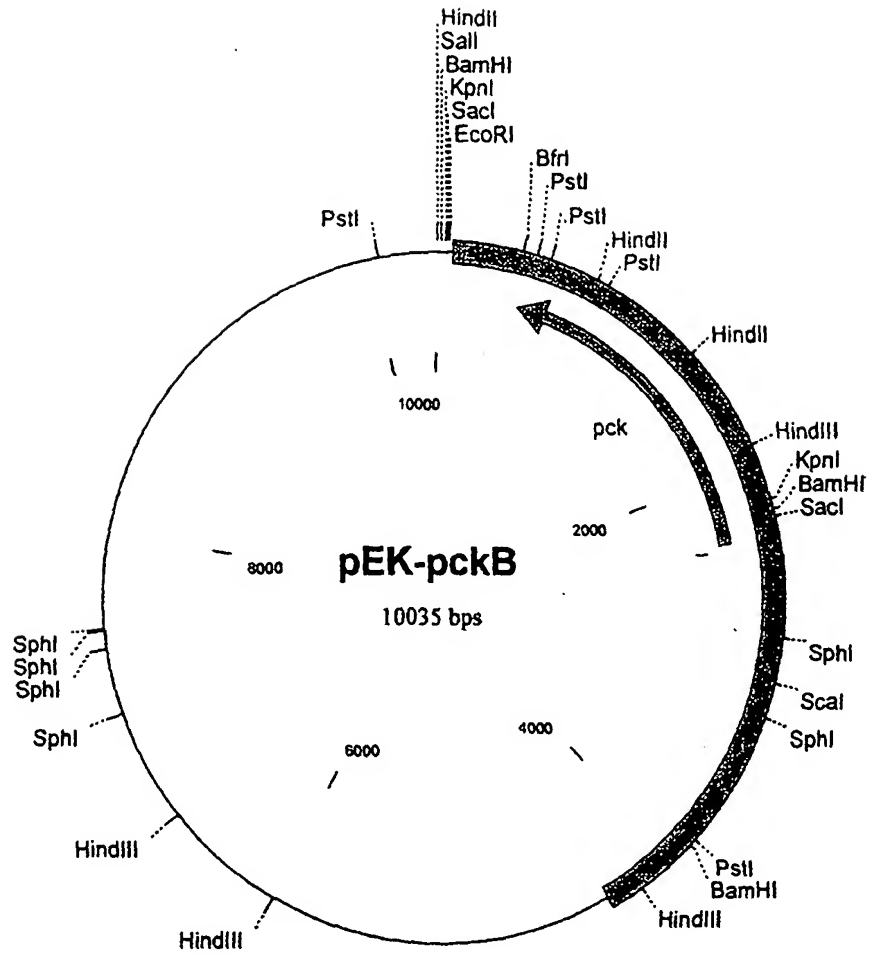
Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1:



Figur 2:



Figur 3:

